

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DA VIOLACEÍNA e DEOXIVIOLOCEINA OTIMIZADO POR PLANEJAMENTO FATORIAL e ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PELA *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*”.

A violaceína é um pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum* com propriedades bactericidas, tripanocidas, tumoricidas, micobactericidas e antioxidantes (Durán e Haun PIBr 9702918-1; Durán e col. PIBr 9801307). O isolamento e purificação do pigmento produzido pela *C. violaceum* tem sido objeto de estudos desde 1913. Autores nesses anos tem aumentado gradualmente o grau de pureza até sua cristalização. Entretanto a obtenção da violaceína a partir da bactéria foi sempre um problema para os pesquisadores devido a baixa produtividade e grande perda de tempo com o processo. Devido ao grande interesse farmacológico e potencial terapêutico da violaceína, otimizou-se o processo de produção de massa celular e a produção da violaceína da *C. violaceum*.

O *C. violaceum* utilizada foi a cepa CCT 3496 da Fundação Tropical André Tosello, Campinas, S.P., Brasil.

Para a otimização do processo foi utilizado técnicas de planejamento experimental: violaceína bruta (violaceína + deoxiviolaceína) e a produção de massa celular são influenciados por vários fatores. Também o nível mais adequado destes fatores para maximizar o produto é desconhecido. Por esta razão uma otimização do processo usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos foi seguido. Estes planejamentos permitem a redução do número de experimentos, que são necessários para otimizar o processo, como também fornecer resultados mais exatos que aqueles obtidos usando procedimentos clássicos univariáveis.

Na fase inicial 11 fatores foram analisados: fonte de carbono (glicose), extrato de levedura, metionina, vitamina B12, L-triptofano, agitação, temperatura, pH (tampão fosfato), peptona, inoculo e concentração de sulfato de zinco. Um planejamento fatorial fracionário 2^{15-11} padrão foi usado. Este planejamento requer 16 experimentos. Este tipo de planejamento fatorial fracionário é apropriado para seleção de fatores, permitindo a identificação daqueles fatores que são mais importantes na otimização da massa celular e na produção da violaceína bruta.

Na Segunda fase, um planejamento composto central envolvendo 5 fatores: fonte de carbono (glicose), extrato de levedura, L-triptofano, peptona e sulfato de zinco. Foram escolhido baseado no resultado de planejamento fatorial fracionário anterior. O planejamento consiste de um fatorial fracionário 2^5 , um planejamento estrela e mais um ponto central em replicatas, para determinar o error e também a falta de ajuste dos modelos estudados. Na fase final da otimização foi utilizado três fatores : fonte de carbono (glicose), extrato de levedura e L-triptofano foram estudados usando o planejamento composto central de três fatores. Os níveis dos fatores usados para este planejamento foram escolhidos baseados nos resultados do planejamento de 5 fatores.

Os resultados do planejamento composto central de três fatores estão na Tabela 1. A produção média de violaceína bruta neste planejamento foi 0,36 g/L. Uns 50% maior que nos outros modelos estudados. A media de massa celular neste modelo foi 16,59 g/L, ao redor de 2,2 vezes maior que nos outros modelos. Os modelos lineares para produção de violaceína bruta e massa celular se mostraram mais adequados estatisticamente que os modelos quadráticos:

Modelo linear: violaceína bruta (V) $MQ_{faj}/MQ_{ep} = 1,04 < F_{11, 3, 0,05} = 8,76$ e $MQ_R/MQ_r = 8,29 > F_{3, 14, 0,05} = 3,34$; massa celular (MC) $MQ_{faj}/MQ_{ep} = 5,00 < F_{11, 3, 0,05} = 8,76$ e $MQ_R/MQ_r = 9,71 > F_{3, 14, 0,05} = 3,34$).

Os modelos tiveram o extrato de levedura como um termo muito significativo:

$$V = 0,360 - 0,016G + 0,033E + 0,001T$$

$$(\pm 0,014) \quad (\pm 0,016) \quad (\pm 0,016) \quad (\pm 0,016)$$

e

$$CM = 16,586 + 0,410G + 2,025E - 0,059T$$

$$(\pm 0,715) \quad (\pm 0,821) \quad (\pm 0,821) \quad (\pm 0,821)$$

Todos os outros termos não foram significativos ao nível de 95% de confiança exceto a glicose, no modelo da violaceína bruta, que é marginalmente significativo.

Aumento maior de extrato de levedura poderia resultar em aumento da violaceína bruta como na produção de massa celular. Isto pode se ver ao examinar o gráfico de superfície de resposta (extrato de levedura vs glicose). Quantidade de violaceína bruta em função da porcentagem de glicose e extrato de levedura são

analisados. A superfície de resposta plana mostra um grande efeito ao longo do eixo do extrato de levedura e da glicose. As respostas de linhas de contorno são praticamente perpendiculares ao eixo de extrato de levedura mostrando uma ascendência na produção de violaceína bruta.

- 5 **Tabela 1.** Planejamento experimental com três fatores para produção de violaceína bruta e massa célula.

Fatores	N í v e i s				
	(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
1 D-Glicose	0,5%	0,84%	1,04%	1,24%	1,58%
2 Extrato levedura	0,6%	0,94%	1,14%	1,34%	1,68%
3 L-Triptofano	0,06%	0,094%	0,114%	0,134%	0,168%

Exp.	Glicose	Levedura	Triptofano	Respostas	
				CM (g L ⁻¹)	V (g L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	15,42	0,35
2	1	-1	-1	15,29	0,35
3	-1	1	-1	17,56	0,39
4	1	1	-1	18,82	0,41
5	-1	-1	1	16,05	0,37
6	1	-1	1	14,91	0,31
7	-1	1	1	17,94	0,44
8	1	1	1	17,81	0,35
9	-1,68	0	0	12,89	0,37
10	1,68	0	0	16,30	0,32
11	0	-1,68	0	10,88	0,28
12	0	1,68	0	21,09	0,43
13	0	0	-1,68	17,43	0,33
14	0	0	1,68	17,18	0,36
CP1	0	0	0	16,80	0,32
CP2	0	0	0	18,06	0,38
CP3	0	0	0	17,56	0,37
CP4	0	0	0	16,55	0,35

(CM) = Massa Celular seca; (V) = Violaceína bruta; (PC) = Ponto Central; % (p/v)

- Através de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta se obtiveram aumentos de massa celular de 7,47 g/L para 21 g/L e de produção de violaceína bruta de 0,17 g/L para 0,44 g/L. O meio de cultura otimizado, nas condições investigadas, para a produção de violaceína bruta foi o seguinte: 0,84% de glicose, 1,24% de extrato de levedura, 1,34% de L-triptofano, 0,10% de peptona, 0,0625 mM de sulfato de zinco, 33 °C e agitação de 300 rpm.
- 10

Análise por HPLC mostram quantidades constantes de violaceína e deoxiviolaceína após 26 horas de fermentação.

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DA VIOLACEÍNA e DEOXIVIOLOCEINA OTIMIZADO POR PLANEJAMENTO FATORIAL e ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PELA *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*” caracterizado por

5 permitir a análise da violaceína e deoxi-violaceína utilizando HPLC.

2. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DA VIOLACEÍNA e DEOXIVIOLOCEINA OTIMIZADO POR PLANEJAMENTO FATORIAL e ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PELA *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*” caracterizado por

10 otimização da produção de violaceína, cujo o meio de cultura ótimo, nas condições investigadas, para a produção de violaceína foram os seguintes: 0,84% de glicose, 1,24% de extrato de levedura, 1,34% de L-triptofano, 0,10% de peptona, 0,0625 mM de sulfato de zinco, 33 °C e agitação de 300 rpm.

RESUMO

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DA VIOLACEÍNA e DEOXIVIOLOCEÍNA OTIMIZADO POR PLANEJAMENTO FATORIAL e ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PELA *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*”.

5 Trata-se de um procedimento para a otimização da produção de violaceína e deoxiviolaceína através de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos. Na fase inicial 11 fatores foram analisados: fonte de carbono (glicose), extrato de levedura, metionina, vitamina B12, L-triptofano, agitação, temperatura, pH (tampão fosfato), peptona, inóculo e concentração de

10 sulfato de zinco. Um planejamento experimental fracionário padrão 2^{15-11} foi usado. Na Segunda fase um planejamento composto central envolvendo 5 fatores: fonte de carbono (glicose), extrato de levedura, L-triptofano, peptona e sulfato de zinco. Foram escolhidos baseados no resultado do planejamento fatorial fracionário anterior. O planejamento consiste em um fatorial fracionário

15 2^5 . Na fase final da otimização três fatores: fonte de carbono (glicose), extrato de levedura e L-triptofano foram estudados usando um planejamento composto central de três fatores. A produção média de violaceína bruta neste planejamento foi 0,36 g/L. Uns 50% maior que nos outros modelos estudados. A média da massa celular para este planejamento foi 16,59 g/L, ao redor de 2,2 vezes maior

20 que nos outros modelos.